

PCT

(PCT Rule 61.2)

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 August 2000 (28.08.00)	in its capacity as elected Office
International application No. PCT/NL99/00786	Applicant's or agent's file reference WO 800126-AI
International filing date (day/month/year) 17 December 1999 (17.12.99)	Priority date (day/month/year) 17 December 1998 (17.12.98)
Applicant MOERMAN, Robert et al	

- ☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 July 2000 (17.07.00)

- ☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was ☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Olivia RANAIVOJAONA</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	--


PATENT COOPERATION TREATY

PCT

09/868408

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference WO 800126-AI	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL99/00786	International filing date (day/month/year) 17/12/1999	Priority date (day/month/year) 17/12/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC B05B5/025		
Applicant TECHNISCHE UNIVERSITEIT DELFT et al.		
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 5 sheets.</p>		
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application 		
Date of submission of the demand 17/07/2000	Date of completion of this report 21.02.2001	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Sbaihi, M Telephone No. +49 89 2399 8436	



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/NL99/00786

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

2-11 as originally filed

1,1a as received on 28/12/2000 with letter of 22/12/2000

Claims, No.:

1-19 as received on 28/12/2000 with letter of 22/12/2000

Drawings, sheets:

1/3-3/3 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/NL99/00786

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-19
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-19
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-19
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:
see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00786

claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet

Reference is made to the following document cited by the applicant:

D3: EP 0258016 A (MINNESOTA MINING AND MANUFACTURING COMPANY)
02 March 1988

Re Item V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Document D3, which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses (cf. fig 1) a method for electro spraying a coating material onto a substrate, from which the subject-matter of independent claim 1 differs in that the inside diameter of the capillary is defined to be less than 150 μm and the distance to be adjusted between the orifice of the feeder and the surface is defined to be less than 2 mm.

The problem to be solved by the present invention may be regarded as how to improve the method of D3 such as being possible to apply liquid to a very small selected portion without any substantial amount of liquid landing outside of this selected portion.

The subject matter of D3 relates to a coating process for applying thin and very thin coatings (controlled thickness) to a substrate; to achieve this, distance between the capillary tip and the substrate for the geometry described is typically between 5 cm and 15 cm (page 4 lines 56-59) and capillary needles must be large enough in inside diameter so that plugging does not occur for normally clean fluids (page 3, lines 53-54); example is given with an inside diameter of 300 μm (page 3, line 61).

In case of willing to coat only a selected portion, D3 suggests to coat through a mask leaving a pattern or to charge the substrate in a pattern (Page 5 line 64 - page 6 line 1), and therefore, the skilled person having this problem to be solved would preferably follow the recommended solution and not obviously change the recommended distance and capillary diameter value.

Thus, the solution proposed in claim 1 of the present application can therefore be considered as novel and involving an inventive step (Article 33(2&3) PCT).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00786

Claims 2-17 are dependent on claim 1 and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents (Rule 70.10)

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 98 58745 A	30 December 1998	19 June 1998	20 June 1997
WO 98 56894 A	17 December 1998	05 June 1998	12 June 1997

Re Item VII

Certain defects in the international application

Although claim 1 is drafted in the two-part form the feature "the inside diameter of the capillary is less than 150 micrometers" should be placed in the characterising portion, as it is not disclosed in document D3 (Rule 6.3(b) PCT).

The features of the claims are not provided with reference signs placed in parentheses (Rule 6.2(b) PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

For clarity purpose (Art. 6 PCT) in independent claim 1:

- it is advisable to express the function of the voltage applied between the orifice and a counter electrode: for instance "a voltage for electro spraying applied ..."
- instead of "directed towards a surface", should read "directed towards the surface of the substrate".

28. 12. 2000

WO 800126-A1/lm/ho

(60)

Method of the dosed application of a liquid onto a surface

The present invention relates to a method of the dosed application of a liquid onto a surface of a substrate, wherein the liquid is fed to a distal tip of a capillary at a flow rate between 0,01 pl/s and 1 ml/s, wherein the distal tip comprises an orifice directed toward a surface, the inside diameter of the capillary is less than 150 μ m and a voltage is applied between the orifice and a counter electrode until the desired amount of liquid has been applied to the selected portion of the surface.

10 WO 98/58745 describes a method of electrospraying solutions to deposit substances, including biomacromolecules, in the form of spots and films on a substrate. Electrospraying occurs at a distance from the substrate of 15-40 mm. The application describes a focusing technique
15 to create small spots of deposited material. This document was published after the priority date of the present application.

The present invention is characterized in that the distance between the orifice and the surface is less than
20 2 mm.

Surprisingly, applicant has found that by means of the electrospraying technique it is possible to apply liquid to a very small selected portion (having a (maximum) diameter of 1 cm or less) without any substantial
25 amount of liquid landing outside of said selected portion. This will also not happen when application times are longer. Then a drop will form, without adversely affecting of the method.

EP-A-0,258,016 describes an electrostatic coating
30 system suitable for applying a very thin coating to a substrate wherein, by means of a potential difference, a coating liquid is reduced to a mist of highly charged droplets, which charged droplets are drawn toward the substrate. Because the charged droplets have the same
35 sign, they repel each other whereby a substantially even coating of the surface is achieved.

1a

The term "capillary" as used in the present application, is understood to define any conduit that makes it possible to allow an aqueous liquid to pass through, and

→
page 2

(60)

CLAIMS

1. A method of the dosed application of a liquid
5 onto a surface of a substrate, wherein the liquid is fed
to a distal tip of a capillary at a flow rate between 0,01
pl/s and 1 ml/s, wherein the distal tip comprises an ori-
fice directed toward a surface, the inside diameter of the
capillary is less than 150 μm and a voltage is applied
10 between the orifice and a counter electrode until the
desired amount of liquid has been applied to the selected
portion of the surface, characterized in that the distance
between the orifice and the surface is less than 2 mm.

2. A method according to claim 1, characterized in
15 that as substrate an object for performing an assay is
used.

3. A method according to claim 1 or 2, character-
ized in that the liquid comprises a biological particle
selected from a single-cell organism, an enzyme, a probe
20 for the detection of a nucleic acid sequence, an enzyme, a
receptor and a ligand.

4. A method according to claim 3, characterized in
that as the receptor an antibody is used.

5. A method according to one of the preceding
25 claims, characterized in that the flow rate varies between
1 pl/s and 1 nl/s, and preferably between 10 and 100 pl/s.

6. A method according to one of the preceding
claims, characterized in that the distance between the
orifice and the surface is 200 to 1000 μm .

30 7. A method according to one of the preceding
claims, characterized in that the selected portion of the
surface is bounded by means for limiting the spreading of
the liquid over the surface.

8. A method according to claim 7, characterized in
35 that a substrate is used whose surface comprises a well
with the selected portion being comprised of the bottom of
the well, wherein a wall of the well contains the spread-
ing of the liquid over the surface.

9. A method according to claim 7 or 8, characterized in that the means to avoid the liquid spreading over the surface is a barrier selected from i) a hydrophilic barrier and ii) a hydrophobic barrier.

5 10. A method according to one of the claims 7 to 9, characterized in that as means a charged barrier is used having a charge whose sign is the same as that of the liquid applied to the surface.

10 11. A method according to one of the preceding claims, characterized in that the application is performed in an atmosphere substantially saturated with vapour from the liquid.

15 12. A method according to one of the preceding claims, characterized in that the application is performed in an atmosphere which, in comparison with atmospheric air, reduces the chance of discharge.

20 13. A method according to one the preceding claims, characterized in that after the application of the liquid onto the selected portion of the surface, the substrate and the orifice are moved in relation to each other in a plane extending substantially perpendicular to the axis of the capillary, and in that a second selected portion of the surface is provided with liquid, which second selected portion does not overlap with the selected portion first
25 provided with liquid.

30 14. A method according to one the preceding claims, characterized in that an array of capillaries is used with the capillaries spaced from each other such that the selected surfaces onto which liquid is to be applied by two neighbouring capillaries, do not overlap.

 15. A method according to one the preceding claims, characterized in that the counter electrode is formed by the substrate.

35 16. A method according to one the claims 1 to 13, characterized in that an electrode is used as counter electrode, which electrode substantially surrounds the selected portion of the surface and which is retained in the vicinity of the surface.

17. A method according to one the preceding claims, characterized in that the amount of applied liquid is measured by means of current and/or voltage characteristics.

5 18. A method according to one the preceding claims, characterized in that a gelling liquid is applied to the selected portion of the surface.

 19. A method according to one the preceding claims, characterized in that the counter electrode is applied
10 underneath the selected surface and is covered with a substantially insulating thin film.



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁷ : B05B 5/025	A1	(11) International Publication Number: WO 00/35590 (43) International Publication Date: 22 June 2000 (22.06.00)
(21) International Application Number: PCT/NL99/00786 (22) International Filing Date: 17 December 1999 (17.12.99) (30) Priority Data: 1010833 17 December 1998 (17.12.98) NL (71) Applicant (for all designated States except US): TECHNISCHE UNIVERSITEIT DELFT [NL/NL]; Julianalaan 134, NL-2628 BL Delft (NL). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): MOERMAN, Robert [NL/NL]; Frankenslag 337, NL-2582 HN Den Haag (NL). FRANK, Johannes [NL/NL]; Hooiland 14, NL-3121 XD Schiedam (NL). MARIJNISSEN, Johannes, Cornelis, Maria [NL/NL]; Zaat 11, NL-4819 ED Breda (NL). (74) Agent: ALTENBURG, Bernardus, Stephanus, Franciscus; Octrooibureau Los En Stigter B.V., Weteringschans 96, NL-1017 XS Amsterdam (NL).		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i> <i>In English translation (filed in Dutch).</i>
(54) Title: METHOD OF THE DOSED APPLICATION OF A LIQUID ONTO A SURFACE (57) Abstract <p>The invention relates to a method of the dosed application of a liquid onto to selected portion of the surface of a substrate (A) by means of spraying under the influence of an electric current. According to the invention the liquid is fed at a flow rate between 0.01 pl/s and 1 ml/s to a distal tip (3) of a capillary (1) having an inside diameter of less than 150 μm, wherein the distance between the distal tip and the surface (A) is less than 2 mm. Surprisingly it has been shown that it is possible in this manner to apply liquid to a restricted surface of a defined size.</p> <div data-bbox="688 1146 1461 1948"> </div>		

SCANNED # 74

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

Method of the dosed application of a liquid onto a surface

The present invention relates to a method of the dosed application of a liquid onto a surface of a substrate, wherein the liquid is fed to a distal tip of a capillary, wherein the distal tip comprises an orifice directed toward the surface, and a voltage is applied between the orifice and a counter electrode capable of overcoming the surface tension of the liquid, and a counter electrode is applied until the desired amount of liquid has been applied to the selected portion of the surface.

Such a method is known as "electro spraying" and is used for applying a coating to a substrate. EP-A-0,258,016 describes an electrostatic coating system suitable for applying a very thin coating to a substrate wherein, by means of a potential difference, a coating liquid is reduced to a mist of highly charged droplets, which charged droplets are drawn toward the substrate. Because the charged droplets have the same sign, they repel each other whereby a substantially even coating of the surface is achieved.

Surprisingly, applicant has found that by means of this technique it is possible to apply liquid to a very small selected portion (having a (maximum) diameter of 1 cm or less) without any substantial amount of liquid landing outside of said selected portion. This will also not happen when application times are longer. Then a drop will form, without adversely affecting of the method.

According to the invention a selected portion of the surface of a substrate may be provided with liquid by feeding the liquid to the distal tip of the capillary at a flow rate between 0.01 pl/s and 1 ml/s, by using a capillary having an inside diameter of less than 150 μ m, while limiting the distance between the orifice and the surface to 2 mm or less.

The term "capillary" as used in the present application, is understood to define any conduit that makes it possible to allow an aqueous liquid to pass through, and

CLAIMS

1. A method of the dosed application of a liquid
5 onto a surface of a substrate, wherein the liquid is fed
to a distal tip of a capillary at a flow rate between 0,01
pl/s and 1 ml/s, wherein the distal tip comprises an ori-
fice directed toward a surface, the inside diameter of the
capillary is less than 150 μm , the distance between the
10 orifice and the surface is less than 2 mm, and a voltage
is applied between the orifice and a counter electrode
until the desired amount of liquid has been applied to the
selected portion of the surface.

2. A method according to claim 1, **characterized** in
15 that as substrate an object for performing an assay is
used.

3. A method according to claim 1 or 2, **character-**
ized in that the liquid comprises a biological particle
selected from a single-cell organism, an enzyme, a probe
20 for the detection of a nucleic acid sequence, an enzyme, a
receptor and a ligand.

4. A method according to claim 3, **characterized** in
that as the receptor an antibody is used.

5. A method according to one of the preceding
25 claims, **characterized** in that the flow rate varies between
1 pl/s and 1 nl/s, and preferably between 10 and 100 pl/s.

6. A method according to one of the preceding
claims, **characterized** in that the distance between the
orifice and the surface is 200 to 1000 μm .

30 7. A method according to one of the preceding
claims, **characterized** in that the selected portion of the
surface is bounded by means for limiting the spreading of
the liquid over the surface.

8. A method according to claim 7, **characterized** in
35 that a substrate is used whose surface comprises a well
with the selected portion being comprised of the bottom of
the well, wherein a wall of the well contains the spread-
ing of the liquid over the surface.

9. A method according to claim 7 or 8, **characterized** in that the means to avoid the liquid spreading over the surface is a barrier selected from i) a hydrophilic barrier and ii) a hydrophobic barrier.

5 10. A method according to one of the claims 7 to 9, **characterized** in that as means a charged barrier is used having a charge whose sign is the same as that of the liquid applied to the surface.

10 11. A method according to one of the preceding claims, **characterized** in that the application is performed in an atmosphere substantially saturated with vapour from the liquid.

15 12. A method according to one of the preceding claims, **characterized** in that the application is performed in an atmosphere which, in comparison with atmospheric air, reduces the chance of discharge.

20 13. A method according to one the preceding claims, **characterized** in that after the application of the liquid onto the selected portion of the surface, the substrate and the orifice are moved in relation to each other in a plane extending substantially perpendicular to the axis of the capillary, and in that a second selected portion of the surface is provided with liquid, which second selected portion does not overlap with the selected portion first
25 provided with liquid.

30 14. A method according to one the preceding claims, **characterized** in that an array of capillaries is used with the capillaries spaced from each other such that the selected surfaces onto which liquid is to be applied by two neighbouring capillaries, do not overlap.

15. A method according to one the preceding claims, **characterized** in that the counter electrode is formed by the substrate.

35 16. A method according to one the claims 1 to 13, **characterized** in that an electrode is used as counter electrode, which electrode substantially surrounds the selected portion of the surface and which is retained in the vicinity of the surface.

17. A method according to one the preceding claims, **characterized** in that the amount of applied liquid is measured by means of current and/or voltage characteristics.

5 18. A method according to one the preceding claims, **characterized** in that a gelling liquid is applied to the selected portion of the surface.

 19. A method according to one the preceding claims, **characterized** in that the counter electrode is applied
10 underneath the selected surface and is covered with a substantially insulating thin film.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 99/00786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B05B5/025

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B05B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 58745 A (UNIV NEW YORK ;MOROZOV VICTOR N (US); MOROZOVA TAMARA YA (US)) 30 December 1998 (1998-12-30) the whole document	1-3,5,7, 10-16
P,X	WO 98 56894 A (UNIV MINNESOTA) 17 December 1998 (1998-12-17) page 15, line 28 -page 16, line 13 page 33, line 8 - line 9 page 27, line 1 - line 6 page 33, line 8 - line 9 page 30, line 29 - line 31 page 30, line 16 - line 18	1,3,5,7, 8,16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2000

Date of mailing of the international search report

14/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Juguet, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 99/00786

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication dat
WO 9858745 A	30-12-1998	AU 8074398 A EP 0988112 A	04-01-1999 29-03-2000
WO 9856894 A	17-12-1998	AU 8059998 A EP 0988370 A	30-12-1998 29-03-2000

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

RECORD COPY

For receiving Office use only

PCT/NL 99/00786
International Application No.17 DEC 1999 (17.12.99)
International Filing DateBUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM
P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) WO 800126-AI

Box No. I TITLE OF INVENTION

Method of the dosed application of a liquid onto a surface

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Technische Universiteit Delft
Julianalaan 134
NL-2628 BL DELFT
the Netherlands

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

+31 15 278 91 11

Facsimile No.

+31 15 278 31 00

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:
NLState (that is, country) of residence
NLThis person is applicant
for the purposes of:all designated
Statesall designated States except
the United States of Americathe United States
of America onlythe States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MOERMAN, Robert
Frankenslag 337
NL-2582 HN DEN HAAG
the Netherlands

This person is:



applicant only



applicant and inventor

inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)State (that is, country) of nationality:
NLState (that is, country) of residence:
NLThis person is applicant
for the purposes of:all designated
Statesall designated States except
the United States of Americathe United States
of America onlythe States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:



agent



common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ALTENBURG, Bernardus Stephanus Franciscus et al.
OCTROOIBUREAU LOS EN STIGTER B.V.
Weteringschans 96
NL-1017 XS AMSTERDAM
the Netherlands

Telephone No.

+31 20 623 68 32

Facsimile No.

+31 20 626 00 07

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

FRANK, Johannes
Hooiland 14
NL-3121 XD SCHIEDAM
the Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
NLState (that is, country) of residence:
NLThis person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MARIJNISSEN, Johannes Cornelis Maria
Zaart 11
NL-4819 ED BREDA
the Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
NLState (that is, country) of residence:
NLThis person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) *(mark the applicable check-boxes; at least one must be marked)*.

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** **GH** Ghana, **GM** Gambia, **KE** Kenya, **LS** Lesotho, **MW** Malawi, **SD** Sudan, **SL** Sierra Leone, **SZ** Swaziland, **UG** Uganda, **ZW** Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** **AM** Armenia, **AZ** Azerbaijan, **BY** Belarus, **KG** Kyrgyzstan, **KZ** Kazakhstan, **MD** Republic of Moldova, **RU** Russian Federation, **TJ** Tajikistan, **TM** Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** **AT** Austria, **BE** Belgium, **CH** and **LI** Switzerland and Liechtenstein, **CY** Cyprus, **DE** Germany, **DK** Denmark, **ES** Spain, **FI** Finland, **FR** France, **GB** United Kingdom, **GR** Greece, **IE** Ireland, **IT** Italy, **LU** Luxembourg, **MC** Monaco, **NL** Netherlands, **PT** Portugal, **SE** Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** **BF** Burkina Faso, **BJ** Benin, **CF** Central African Republic, **CG** Congo, **CI** Côte d'Ivoire, **CM** Cameroon, **GA** Gabon, **GN** Guinea, **GW** Guinea-Bissau, **ML** Mali, **MR** Mauritania, **NE** Niger, **SN** Senegal, **TD** Chad, **TG** Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the *(mark the kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> |

Precautionary Designation Statement In addition to the designations made above the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn. At the expiration of that time limit (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

B x N . VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 17.12.98 (17 Dec. 98)	1010833	NL		
item (2)				
item (3)				

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): 1

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) <small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</small> ISA /	Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)
---	--

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets : request : 4 description (excluding sequence listing part) : <u>12</u> claims : 3 abstract : 1 drawings : 3 sequence listing part of description : Total number of sheets : <u>22</u>	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify): Copy of Search Report
---	---

Figure of the drawings which should accompany the abstract: <u>2</u>	Language of filing of the international application: <u>Dutch</u>
---	--

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Amsterdam, 13 December, 1999

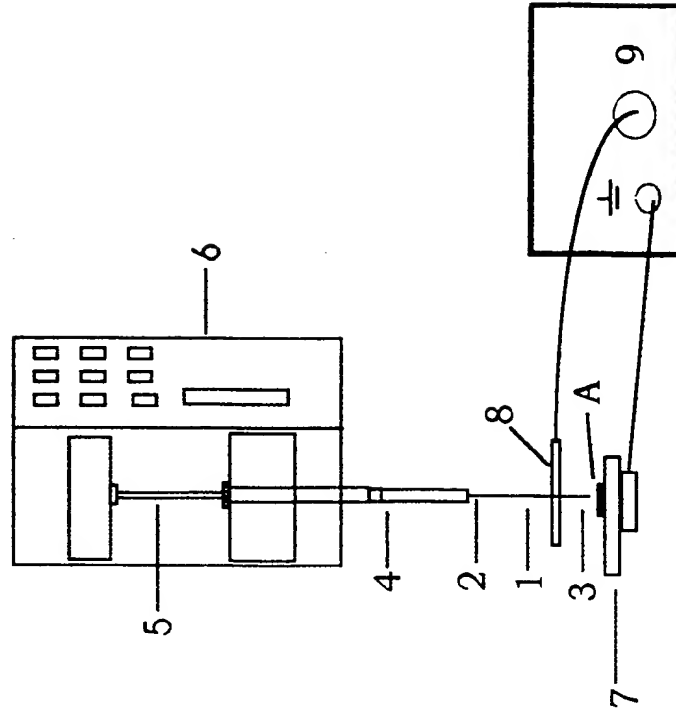
[Signature]

ALTENBURG, Bernardus Stephanus Franciscus et al.

For receiving Office use only		2. Drawings: <input checked="" type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:	17 DEC 1999 (17.12.99)	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	20 JANUARY 2000 (20.01.00)

fig. 1.



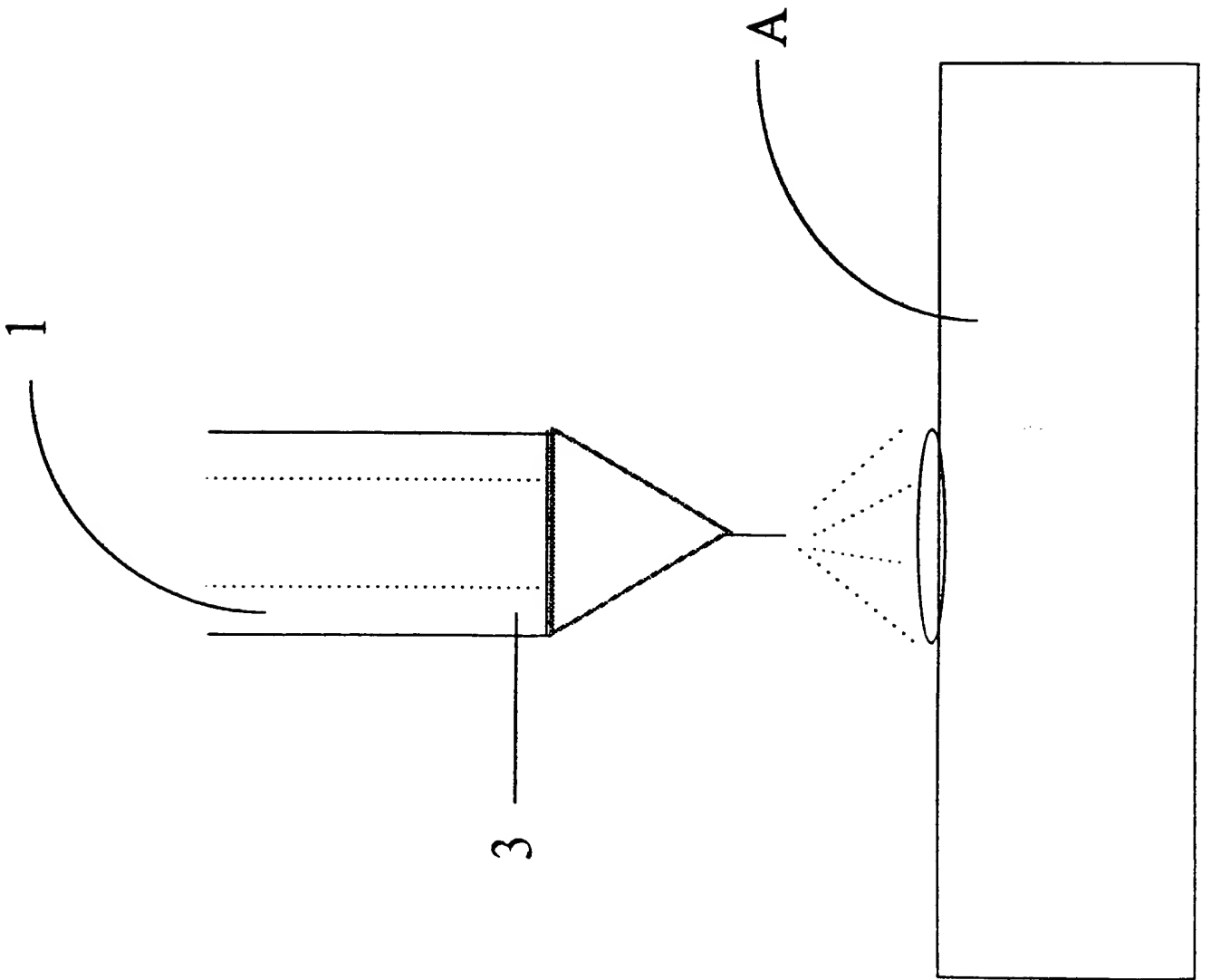
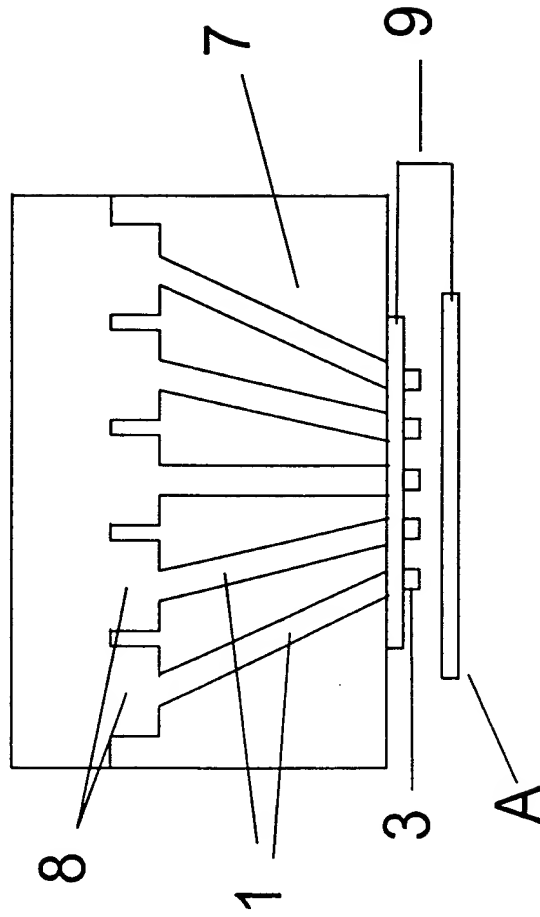


fig. 2.

fig. 3.



WO 800126-A1/ho

Werkwijze voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een oppervlak

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een oppervlak van een substraat, waarbij de vloeistof naar een distaal uiteinde van een capillair wordt gevoerd, waarbij
5 het distale uiteinde een naar het oppervlak gekeerd mondstuk omvat, en een de oppervlaktespanning van de vloeistof overwinnende spanning wordt aangelegd tussen het mondstuk en een tegenelektrode tot de gewenste hoeveelheid vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak is aangebracht.

10 Een dergelijke werkwijze is bekend als "elektro-spraying" en wordt gebruikt voor het aanbrengen van een bekleding op een substraat. Zo beschrijft EP-A-0.258.016 een elektrostatisch bekledingssysteem geschikt voor het aanbrengen van een zeer dunne bekleding op een substraat, waarbij
15 een bekledingsvloeistof door middel van een potentiaal verschil tot een mist van sterk geladen druppeltjes wordt verstoven, welke geladen druppeltjes naar het substraat worden getrokken. Door de qua teken gelijke lading van de druppeltjes stoten zij elkaar af waardoor het oppervlak in hoofdzaak
20 egaal kan worden bedekt.

Verrassenderwijze heeft aanvraagster gevonden dat het met deze techniek mogelijk is om een klein gekozen deel (met een (grootste) diameter van 1 cm of minder) van het oppervlak van vloeistof te voorzien zonder dat een wezenlijke
25 hoeveelheid vloeistof buiten dit gekozen deel terecht komt. Dit gebeurt ook niet bij langere aanbrengtijden. Dan vormt zich een druppel die geen verstoring van de werkwijze met zich mee blijkt te brengen.

Volgens de uitvinding kan een gekozen deel van het oppervlak van een substraat van vloeistof worden voorzien
30 door de vloeistof naar het distale uiteinde van het capillair te voeren met een debiet tussen 0,01 pl/s en 1 ml/s, een capillair te gebruiken met een inwendige diameter van minder dan 150 μ m en de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak
35 te beperken tot 2 mm of minder.

Onder de term "capillair" zoals in de onderhavige aanvraag gebruikt, dient elk kanaal te worden verstaan dat mogelijk maakt een waterige vloeistof te laten passeren en wanneer wordt gesproken over de breedte van een capillair
5 betreft dit (vanzelfsprekend) de inwendige diameter van het kanaal.

Wanneer wordt gesproken over de inwendige diameter van het capillair, dan betreft dit in het bijzonder de inwendige diameter van het naar het substraat gekeerde distale
10 uiteinde daarvan.

Wanneer gesproken wordt over het aanleggen van een spanning tussen het mondstuk en een tegenelektrode, dan omvat dit, zoals voor de vakman duidelijk is, het aanleggen van een spanning tussen de vloeistof in een elektrisch niet geleidend
15 mondstuk van het capillair en de tegenelektrode.

Aldus kan op een beperkt oppervlak met een gedefinieerde grootte vloeistof worden aangebracht.

De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding is dan ook, bijvoorbeeld, zeer geschikt voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een object voor het uitvoeren van een analyse. Het object kan bijvoorbeeld een microtiterplaat zijn, een substraat zoals dat kan worden vervaardigd door middel van uit de halfgeleiderindustrie bekende technieken zoals op silicium gebaseerde substraten, en dergelijke.
20

Voor het uitvoeren van een analyse bevat de vloeistof bij voorkeur een biologisch deeltje gekozen uit een eencellige organisme, een enzym, een probe voor detectie van een nucleïnezuurvolgorde, een enzym, een receptor en een ligand. Overigens is het ook denkbaar om kleine meercellige organismen en weefsels met de vloeistof op te brengen, mits de binnendiameter van het capillair dit toelaat.
25
30

Als probe voor detectie van een nucleïnezuurvolgorde wordt met voordeel gebruik gemaakt van een oligonucleotide, zoals in het vak welbekend. Onder een receptor wordt in de onderhavige aanvraag een eiwit verstaan dat specifiek een ligand kan herkennen. Een dergelijke receptor kan bijvoorbeeld een membraanreceptor zijn. Volgens een zeer gunstige uitvoeringsvorm is de receptor een antilichaam. Met voordeel is ten minste het gekozen deel van het oppervlak van het
35

substraat ingericht om het biologische deeltje covalent te koppelen.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm wordt het opbrengen uitgevoerd in een atmosfeer die althans nagenoeg verzadigd is met damp van de vloeistof.

Hierdoor wordt de kans op Rayleigh-opbreking van geladen druppeltjes verkleind, en daarmee wordt bevorderd dat er geen vloeistof buiten het gekozen deel van het oppervlak terecht komt.

Volgens een verdere uitvoeringsvorm geschiedt het opbrengen in een atmosfeer die de kans op ontlading, in vergelijking met atmosferische lucht, verkleint.

Derhalve kan, mits een eventuele biologische activiteit van een in de vloeistof aanwezig biologisch deeltje in hoofdzaak niet nadelig wordt beïnvloed, de kans op schade aan het substraat worden verkleind door het gebruik van, bijvoorbeeld, een aan stikstof verarmde atmosfeer. De atmosfeer omvat bij voorkeur een ten opzichte van lucht relatief verhoogd gehalte van één of meer gasen met een relatief hoge elektronenaffiniteit. Zo omvat de atmosfeer geschikt SF_6 of een verhoogd gehalte aan CO_2 .

Een zeer belangrijke uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding wordt gekenmerkt doordat na het aanbrengen van de vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak, het substraat en het mondstuk ten opzichte van elkaar worden bewogen in een vlak dat in hoofdzaak loodrecht op de as van het capillair staat, en een tweede gekozen deel van het oppervlak van vloeistof wordt voorzien, welk tweede gekozen deel niet overlapt met het eerst van vloeistof voorziene gekozen deel.

In plaats daarvan, of daarenboven, wordt bij voorkeur een array van capillairen toegepast, waarbij de capillairen op een zodanige onderlinge afstand van elkaar zijn geplaatst, dat de gekozen oppervlakken waarop door twee naburige capillairen vloeistof wordt aangebracht niet overlappen.

Met behulp van dergelijke werkwijzen kan het substraat worden voorzien van een groot aantal niet-overlappende gekozen delen, waardoor het mogelijk wordt om veel assays

tegelijk uit te voeren.

Volgens een eerste uitvoeringsvorm wordt de tegenelektrode gevormd door het substraat.

5 In een dergelijk geval omvat het substraat een geleider of halfgeleider, of zijn deze op het substraat aangebracht.

Volgens een alternatieve uitvoeringsvorm wordt als de tegenelektrode een elektrode toegepast welke het gekozen deel van het oppervlak in hoofdzaak omgeeft en nabij het oppervlak wordt gehouden. In de onderhavige aanvraag wordt onder de term "nabij het oppervlak" tegen of op afstand van het oppervlak verstaan, met dien verstande dat in het laatste geval de tegenelektrode zich gebruikelijk op minder dan de helft van de afstand tussen het uiteinde van het capillair en het substraat bevindt.

Deze uitvoeringsvorm heeft als voordeel dat niet-geleidende substraten, zoals bijvoorbeeld microtiterplaten van polystyreen, met behulp van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding van vloeistof kunnen worden voorzien. Hierbij kunnen de substraten met verhoogde concentraties van, bijvoorbeeld, antilichamen snel worden bekleed, zonder dat dit gepaard gaat met verhoogde kosten als gevolg van verspilling van uitgangsmateriaal. Er worden immers slechts kleine volumina vloeistof op het oppervlak aangebracht.

25 Volgens een interessante uitvoeringsvorm wordt de hoeveelheid aangebrachte vloeistof gemeten aan de hand van stroom- en/of spanningskarakteristieken.

Aldus kan de dosering van vloeistof in de tijd worden gevolgd.

30 Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm ligt het debiet tussen 1 pl/s en 1 nl/s, en bij voorkeur tussen 10 en 100 pl/s.

Dergelijke debieten zijn zeer geschikt voor het aanbrengen van minuscule hoeveelheden vloeistof op een zeer klein deel van het oppervlak van het substraat. Hierbij kan worden gedacht aan een deel met een oppervlak van 1 mm² of minder, en in het bijzonder 0,1 mm² of minder.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is bij het aanbrengen van vloeistof op een klein gekozen deel met een

oppervlakte van 1 mm² of minder de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak 200 tot 1000 µm.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm wordt het gekozen deel van het oppervlak begrensd door een middel voor
5 het zich over het oppervlak verspreiden van de vloeistof.

Aldus wordt het verkrijgen van een in hoofdzaak homogene vloeistoflaag op het gekozen deel bevorderd en wordt de kans verkleind dat vloeistof buiten het gekozen deel terecht komt.

10 Volgens een eerste uitvoeringsvorm wordt een substraat met op het oppervlak een putje toegepast en het gekozen deel de bodem van het putje omvat, waarbij het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak door een wand van het putje wordt beperkt.

15 Volgens een tweede uitvoeringsvorm wordt als middel voor het verhinderen van het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak gebruik gemaakt van een barrière gekozen uit i) een hydrofiele barrière en ii) een hydrofobe barrière. Bij een polaire vloeistof wordt dan een hydrofobe
20 barrière gebruikt, en bij een a-polaire een hydrofiele.

Verder kan als middel een geladen barrière worden toegepast met een lading die qua teken hetzelfde is als die van de op het oppervlak aangebrachte vloeistof.

Volgens een alternatieve en/of aanvullende uitvoeringsvorm kan het gekozen gebied waarop vloeistof moet worden
25 aangebracht zijn voorzien van een middel dat verspreiding over het oppervlak van het gekozen gebied bevordert. Hierbij kan worden gedacht aan een suiker of een oppervlakte-actieve stof. Het middel kan bijvoorbeeld middels een druktechniek
30 worden aangebracht. Aldus wordt bevorderd dat de vloeistof daadwerkelijk het gekozen gebied beslaat. Dit is in het bijzonder van belang als het gekozen gebied niet rond is, met name hoekpunten bezit, zoals een rechthoek is.

De onderhavige uitvinding zal thans worden toegelicht aan de hand van de tekening, waarin
35

fig. 1 een inrichting weergeeft voor het uitvoeren van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding;

fig. 2 een detail van een alternatieve uitvoeringsvorm weergeeft; en

fig. 3 een andere uitvoeringsvorm van een inrichting voor het toepassen van de werkwijze volgens de uitvinding weergeeft.

In fig. 1 is een capillair 1 weergegeven met een eerste uiteinde 2 en een tweede uiteinde 3. Het eerste uiteinde 2 is aangesloten op een 25 microliter Hamilton injectiespuit 4. Deze injectiespuit 4 bevat de op een substraat A op te brengen vloeistof, in het onderhavige geval 0,3 M NaCl in een ethyleenglycol-watermengsel (70/30 vol.%/vol.%). De plunjer 5 van de injectiespuit 4 wordt in de weergegeven uitvoeringsvorm bewogen door een Harvard PHD 2000 infusiepomp 6 (Antec, Leiden, Nederland). Deze infusiepomp 6 transporteert de vloeistof B naar het distale uiteinde 3 van het capillair 1. Het hier gebruikte capillair 1 heeft een binnendiameter van 110 μm en een buitendiameter van 210 μm . Bij de hier weergegeven uitvoeringsvorm is het capillair 1 van metaal.

Het in fig. 1 schematisch weergegeven substraat A is een halfgeleidend silicium micro-array met 25 putjes, welke zijn gevormd door middel van nat etsen, onder gebruikmaking van in de halfgeleiderindustrie welbekende technieken. De putjes waren rechthoekig met zijden van 200 μm . De diepte was 20 μm . Het (half)geleidende substraat A rust op een metalen plaat 7. Het capillair 1 is via een metalen houder 8, waarin ook meer dan een capillair kan zijn opgenomen, verbonden met de positieve elektrode van een hoogspanningsbron 9 (HCN 12500, Air Parts, Alphen aan de Rijn, Nederland).

Vanaf het distale uiteinde 3 van het capillair 1 kan middels de door voedingsbron 9 aangelegde hoogspanning van bijvoorbeeld 1 - 2 kilovolt de oppervlaktespanning worden overwonnen waardoor uiterst kleine druppeltjes vanaf het uit tweede uiteinde 3 naar het substraat A, en in het bijzonder een daarin aangebracht putje C worden getransporteerd. Een putje kan met meer dan één vloeistof worden gevuld, waardoor in een zeer klein reactievolume een assay kan worden uitgevoerd.

Vóór het aanleggen van het potentiaalverschil wordt overtollige vloeistof rond het distale uiteinde 3 verwijderd. In fig. 2 is te zien hoe een deel van het een substraat A

wordt bedekt met vloeistof. Het distale uiteinde 3 van het capillair 1 (een buitendiameter van 210 μm en een binnendiameter van 110 μm) bevond zich op een afstand van 400 - 450 μm tot het oppervlak van het substraat A. Er werd een spanning van 1,45 kV aangelegd en het debiet van de pomp was 50 pl/s. Bij 2 - 40 seconden verstuiwen was de diameter van het met vloeistof bedekte deel van het oppervlak 300 - 350 μm . In tabel I zijn meetgegevens weergegeven voor een debiet van 150 en 300 pl/s. Bij een lange verstuiwingsduur gaat de dunne vloeistoflaag op het gekozen deel over in een druppel zonder dat dit een nadelige invloed heeft op het verstuiwen en er treedt geen doorslag op.

Tabel I Diameter van het gekozen deel in μm

Debiet 300 pl/s				
Afstand [μm]	450	400	350	300
Conuslengte	262.5	236.25	236.25	225.75
Afstand* [μm]	187.5	163.75	113.75	74.25
Pot.verschil [Kv]	1.34	1.29	1.22	1.22
Diameter [μm]	450	390	340	300
Debiet 150 pl/s				
Afstand [μm]	450		350	300
Conuslengte [μm]	236.25		262.5	220.5
Afstand* [μm]	213.75		87.5	79.5
Pot.verschil [Kv]	1.34		1.2	1.2
Diameter [μm]	350		280	240

* Tussen tip van de vloeistofconus aan het capillair en substraatoppervlak

Gekozen delen van het oppervlak van het substraat A kunnen ook met een oligonucleotide probe worden bekleed. In de onderhavige uitvinding wordt onder een oligonucleotide probe elk nucleïnezuurpolymeer verstaan met een lengte welke geschikt is voor het selectief hybridiseren met een complementaire RNA- of DNA-streng in een te onderzoeken monster.

Het is voor de vakman duidelijk dat diverse andere in het vak algemeen bekende werkwijzen voor het uitvoeren van assays met de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding kunnen worden uitgevoerd. Zo kunnen de gekozen delen ook

worden voorzien van al dan niet verschillende (monoclonale) antilichamen, die een te detecteren antigeen (of scala van antigenen) kunnen herkennen. Ook kunnen tezamen met de vloeistof reagentia, zoals een enzymsubstraat of een middel voor het aantonen van een gevormd complex, worden opgebracht, zoals voor de vakman duidelijk is. Ook zal, indien wordt gewenst het biologische deeltje te immobiliseren, een voor het op te brengen biologische deeltje in het vak bekend daarvoor geschikt substraat worden gebruikt. Dit oppervlak kan het deeltje al dan niet covalent binden. Voor niet-covalente immobilisatie van nucleïnezuren kan bijvoorbeeld een goudoppervlak worden toegepast.

De tegenelektrode kan de vorm hebben van een in zichzelf gesloten structuur waarvan het middelpunt bij projectie op het oppervlak in hoofdzaak samenvalt met het van vloeistof te voorziene deel van het oppervlak. Indien de tegenelektrode zich niet op het oppervlak van het substraat bevindt, of daar tegen wordt gehouden, en zich derhalve tussen het substraat A en het tweede uiteinde 3 van het capillair 1 bevindt, zal het oppervlak van de doorsnede van de tegenelektrode in het algemeen kleiner zijn dan de oppervlakte van het gekozen deel. De tegenelektrode zal in de meeste gevallen een ringvormige elektrode zijn, maar ook anders gevormde, in het bijzonder vierkante tegenelektroden zijn denkbaar. Bij het gebruik van een niet met het substraat verbonden tegenelektrode zal de tegenelektrode in het algemeen vast, bij voorkeur op afstand van het tweede uiteinde 3 instelbaar, op niet geleidende wijze met het capillair 1 zijn verbonden. Dit vergemakkelijkt het reproduceerbaar aanbrengen van vloeistof wanneer een spanning over het tweede uiteinde 3 en de tegenelektrode wordt aangelegd.

Indien de vloeistof op niet-ronde delen van het oppervlak moet worden aangebracht, verdient het aanbeveling gebruik te maken van een capillair en/of een tegenelektrode met een overeenkomstige niet-ronde vorm. De tegenelektrode kan daarbij een niet-vlakke tegenelektrode zijn. Bij een dergelijke tegenelektrode is de afstand van elk punt van de elektrode tot het distale uiteinde 3 van het capillair 1 in hoofdzaak constant.

Het is denkbaar dat niet het capillair 1 met de voedingsbron is verbonden, doch dat de spanning tussen het tweede uiteinde 3 en de tegenelektrode op andere wijze wordt aangelegd. Zo kan bijvoorbeeld in de op te brengen vloeistof
5 een elektrode (niet weergegeven) zijn gebracht, welke als eerste elektrode op de hoogspanningsbron is aangesloten en de tweede elektrode door het substraat wordt gevormd.

Een dergelijke uitvoeringsvorm kan in het bijzonder nuttig zijn wanneer een array van capillairen wordt toege-
10 past, welke elk met een eigen spanning worden bedreven. Ook kunnen in een dergelijk geval de injectiespuiten individueel door een pomp worden bedreven. Indien het risico bestaat dat aanliggende capillairen elkaar zouden beïnvloeden, kan de afstand tussen de capillairen ook groter zijn, zoals 2 keer
15 zo groot, en kunnen de delen van het oppervlak die niet door een capillair worden bestreken na een geschikte translatie van het array of het substraat van vloeistof worden voorzien.

Bij gebruik van meer dan één capillair, kan het teken van de spanning tussen een eerste capillair en het
20 substraat tegengesteld zijn aan die tussen een aanliggend capillair en het substraat. In het bijzonder kan dan ook één gekozen deel van het oppervlak met twee (of meer) capillairen worden gevuld. Hierdoor wordt de verspreiding van vloeistof buiten het gekozen deel verder beperkt. Dit betreft zowel de
25 verspreiding van verstoven vloeistof alsmede van reeds opgebrachte vloeistof. De neutralisatie betekent ook dat geen of minder ladingtransport door het substraat noodzakelijk is, hetgeen het scala aan substraten dat zonder losse tegen het oppervlak te houden elektrode kan worden gebruikt, verder
30 vergroot. In de hier geschetste situatie kan het gunstig zijn als de naar het substraat gekeerde distale uiteinden van de capillairen niet parallel met elkaar verlopen maar een hoek maken. Zij zijn bij voorkeur beide naar het midden van het gekozen deel gericht. Het (bij voorkeur tegelijk) benutten
35 van twee (of meer) capillairen voor het aanbrengen van vloeistof op een gekozen deel, biedt ook diverse mogelijkheden voor het uitvoeren van reacties tussen in de door de capillairen aangevoerde verschillende vloeistoffen. In het bijzonder wordt hierbij gewezen op de uitstekende menging van de

vloeistoffen die kan worden bereikt met de werkwijze volgens de uitvinding.

De met de werkwijze volgens de uitvinding op te brengen vloeistof(fen) moet over een toereikende geleidbaarheid bezitten, zoals in het vak welbekend. De vloeistof kan, zoals hierboven aangegeven, reagentia bevatten, maar ook reagentia op dragers of dragers waarop reagentia moeten worden aangebracht. Zo kan met de werkwijze volgens de uitvinding op een gekozen deel van het substraat bijvoorbeeld een colloïdale oplossing van goud, latex en dergelijke worden opgebracht. Van dergelijke materialen is bekend dat het uitstekende dragers zijn voor nucleïnezuur-probes en antilichamen.

Naast het variëren van de spanning voor het aan- en uitschakelen van het verstuijproces, kan in plaats daarvan of tegelijk ook de afstand tussen capillair en substraat worden vergroot. Dit gebeurt bij voorkeur in korte tijd, zoals een onderdeel van een seconde. Gebleken is dat door het vergroten van de afstand de vorm van de vloeistofconus niet wezenlijk verandert en vloeistof reproduceerbaar kan worden opgebracht.

Voor een reproduceerbaar opstartgedrag, en om in het algemeen om de controle over het opbrengen te maximaliseren, kan het wenselijk zijn informatie te verkrijgen over de vloeistofmeniscus aan het tweede uiteinde 3. Dit kan op diverse wijzen geschieden, bijvoorbeeld door het meten van de capaciteit (onder gebruikmaking van een op de hoogspanningsgelijkspanning gesuperponeerde wisselspanning) of langs optische weg. In het laatste geval kan met voordeel gebruik worden gemaakt van het feit dat de vloeistofmeniscus van vorm verandert. Zo kan via het eerste uiteinde 2 licht in het capillair 1 worden gekoppeld, welk capillair 1 als golfgeleider fungeert. Door meting van de hoeveelheid door de meniscus gereflecteerd licht kan dit als parameter worden gebruikt voor het bedienen van de pomp en het onderzoeken van het opstartgedrag (de eerste vorming van microdruppeltjes). Dit gedrag zal afhangen van de toegepaste vloeistof en daarin opgenomen stoffen zoals zouten.

Een geschikte uitvoeringsvorm van de inrichting voor het toepassen van de onderhavige uitvinding is weergegeven in

fig. 3. In een blok kunststof 7 zijn capillairen 1 aangebracht. Hiertoe worden bijvoorbeeld in een vlakke zijde van een eerste kunststofdeel gleuven gefreesd, waarna een tweede kunststofdeel aan de zijde met de gleuven wordt bevestigd onder oplevering van de capillairen 1. Het verbinden van de kunststofdelen kan bijvoorbeeld geschieden door middel van lijmen of een andere in het vak bekende techniek. De kanalen kunnen zijn voorzien van in een derde kunststofdeel uitgespaarde vloeistofreservoirs 8 welke aan een proximale van de capillairen 1 elk in verbinding staan met één capillair. De kunststof delen kunnen op elke bekende geschikte wijze worden vervaardigd, zoals door middel van spuitgieten of heet vervormen ("hot embossing"). Verplaatsing van vloeistof vanuit een vloeistofreservoir 8 kan geschieden door het aanleggen van (gas)druk over alle vloeistofreservoirs 8 gezamenlijk of elk vloeistofreservoir afzonderlijk.

De capillairen 1 zijn aan het distale uiteinde ervan voorzien van mondstukken. Dit wordt bij voorkeur bereikt met behulp van een door middel van uit de halfgeleiderindustrie bekende technieken vervaardigde, van mondstukken voorziene chip. Deze chip is tevens geschikt voorzien van elektroden.

De tegenelektrode kan volgens de uitvinding het gekozen oppervlak waar vloeistof op moet worden opgebracht beslaan, terwijl het het gekozen oppervlak omringende oppervlak slechter of niet geleidend is. Ook is het mogelijk dat het gekozen oppervlak in wezen een slechter of niet-geleidend oppervlak is, dat van een groot aantal kleine elektroden is voorzien die over het gekozen oppervlak zijn verspreid. Dergelijke uitvoeringsvormen kunnen met behulp van algemeen bij de vakman bekende technieken voor het vervaardigen van halfgeleiders worden vervaardigd.

Een tegenelektrode kan ook onder het gekozen oppervlak zijn aangebracht, welk gekozen oppervlak slechter of niet-geleidend is. Echter, de dikte van de aangebrachte dunne film bepaalt in zeer sterke mate de hoeveelheid vloeistof die op het gekozen oppervlak kan worden aangebracht. De dikte zal in het algemeen zeer gering zijn. Volgens een bijzonder aspect van de uitvinding kan deze beperking, die het gevolg is van ladingsophoping op het gekozen oppervlak, met voordeel

worden toegepast voor het beperken van de hoeveelheid op het gekozen oppervlak aangebrachte vloeistof.

5 Met de werkwijze volgens de uitvinding kan ook een vloeistof worden aangebracht die bij een lagere temperatuur vast wordt (zoals agarose of dergelijke) of uithardt (bij-
voorbeeld acrylamide) onder oplevering van een waterige gel, welke een zekere mate van vormvastheid verschaft. Eventueel kunnen vervolgens met de werkwijze volgens de uitvinding een
10 of meer verdere vloeistoffen worden aangebracht, zoals vloeistoffen die een reagens bevatten.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een gekozen deel van het oppervlak van een substraat, waarbij de vloeistof met een debiet tussen 0,01 pl/s en 1 ml/s naar een distaal uiteinde van een capillair
5 wordt gevoerd, waarbij het distale uiteinde een naar het oppervlak gekeerd mondstuk omvat, de inwendige diameter van het capillair minder dan 150 μm is, de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak minder dan 2 mm is, en een de oppervlaktespanning van de vloeistof overwinnende spanning
10 wordt aangelegd tussen het mondstuk en een tegenelektrode tot de gewenste hoeveelheid vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak is aangebracht.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat als substraat een object voor het uitvoeren van een
15 analyse wordt toegepast.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, **met het kenmerk**, dat de vloeistof een biologisch deeltje bevat gekozen uit een eencellige organisme, een enzym, een probe voor detectie van een nucleïnezuurvolgorde, een enzym, een recep-
20 tor en een ligand.

4. Werkwijze volgens conclusie 3, **met het kenmerk**, dat als de receptor een antilichaam wordt gebruikt.

5. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het debiet tussen 1 pl/s en 1 nl/s, en
25 bij voorkeur tussen 10 en 100 pl/s ligt.

6. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak 200 tot 1000 μm is.

7. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies,
30 **met het kenmerk**, dat het gekozen deel van het oppervlak wordt begrensd door een middel voor het beperken van het zich over het oppervlak verspreiden van de vloeistof.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, **met het kenmerk**, dat een substraat met op het oppervlak een putje wordt toege-
35 past en het gekozen deel de bodem van het putje omvat, waarbij het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak

door een wand van het putje wordt beperkt.

9. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, **met het kenmerk**, dat als middel voor het verhinderen van het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak gebruik wordt
5 gemaakt van een barrière gekozen uit i) een hydrofiele barrière en ii) een hydrofobe barrière.

10. Werkwijze volgens één van de conclusies 7 tot 9, **met het kenmerk**, dat als middel een geladen barrière wordt toegepast met een lading die qua teken hetzelfde is als die
10 van de op het oppervlak aangebrachte vloeistof.

11. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het opbrengen wordt uitgevoerd in een atmosfeer die althans nagenoeg verzadigd is met damp van de vloeistof.

12. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het opbrengen wordt uitgevoerd in een atmosfeer welke de kans op ontlading, in vergelijking met atmosferische lucht, verkleint.

13. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat na het aanbrengen van de vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak, het substraat en het mondstuk ten opzichte van elkaar worden bewogen in een vlak dat in hoofdzaak loodrecht op de as van het capillair staat, en een tweede gekozen deel van het oppervlak van vloeistof
20 wordt voorzien, welk tweede gekozen deel niet overlapt met het eerst van vloeistof voorziene gekozen deel.

14. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat een array van capillairen wordt toegepast, waarbij de capillairen op een zodanige onderlinge
30 afstand van elkaar zijn geplaatst, dat de gekozen oppervlakken waarop door twee naburige capillairen vloeistof wordt aangebracht niet overlappen.

15. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat de tegenelektrode wordt gevormd door het
35 substraat.

16. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 13, **met het kenmerk**, dat als de tegenelektrode een elektrode wordt toegepast welke het gekozen deel van het oppervlak in hoofdzaak omgeeft en nabij het oppervlak wordt gehouden.

17. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de hoeveelheid aangebrachte vloeistof wordt gemeten aan de hand van stroom en/of spanningskarakteristieken.

5 18. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat een gelvormende vloeistof op een gekozen deel van het oppervlak wordt aangebracht.

10 19. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de tegenelektrode onder het gekozen oppervlak is aangebracht is en bedekt is met een in hoofdzaak isolerende dunne film.

UITTREKSEL

De uitvinding betreft een werkwijze voor het gedo-
seerd aanbrengen van een vloeistof op een gekozen deel van
het oppervlak van een substraat door middel van verstuiven
onder invloed van een elektrische spanning. Volgens de uit-
5 vinding wordt de vloeistof met een debiet tussen 0,01 pl/s en
1 ml/s naar een distaal uiteinde van een capillair met een
inwendige diameter van minder dan 150 μ m gevoerd, waarbij de
afstand tussen het distale uiteinde en het oppervlak minder
dan 2 mm is. Verrassenderwijze is gebleken dat aldus vloei-
10 stof op een beperkt oppervlak met een gedefinieerde grootte
kan worden aangebracht.